اثر ضدتوموری والپروئیک اسید و ۲۵،۱ دی‌هیدروکسی ویتامین D3 بر سلول‌های سرطانی HL-60

مریم رحیمی

:دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۱/ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰/ چاپ: ۱۳۹۷/۳/۲۰

گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
ایمیل: m.rahimi@malayeru.ac.ir

چکیده. گزارش شده که ۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 یک شکل فعال ویتامینD رشد تعدادی از سلول‌های سرطانی پوست، پروستات، سینه، کولون و لوسمی را مهار می‌کند. والپروئیک اسید، به عنوان یک مهارکنندهٔ قوی هیستون داستیلاز، همچنین نقش مهمی در مهار تکثیر سلول‌های تومور ایفا می‌کند. با این حال، تا کنون هیچ گزارشی در مورد همکاری بین والپروئیک اسید و ۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 برای اثر ضد سرطانی وجود ندارد. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی این بود که آیا دوزهای کم۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامینD3 سمیت والپروئیک اسید را تقویت می‌کند و آیا این عمل از طریق مکانیزم های آپوپتوز انجام می‌گیرد. در این مطالعه سلول هایHL-60 با غلظت های مختلف والپروئیک اسید و ۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر در ۲۴ساعت تیمار شدند. درصد زنده بودن سلول‌ها به روش MTT سنجیده شد و سپس برای بررسی نوع مرگ سلولی از رنگ‌آمیزی Hoechst استفاده شد. مطالعه حاضر نشان داد که۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 اثر آنتی توموری والپروئیک اسید را افزایش می‌دهد. همچنین نتایج حاصل از رنگ آمیزی سلول‌ها نشان داد که والپروئیک اسید و ۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های HL-60 می‌شوند. در کل ترکیب جدید والپروئیک اسید و ۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 هم افزایی اثر ضد تکثیری و القاء آپوپتوز در روی سلول‌های سرطانی HL-60 را نشان داد.

واژه‌های کلیدی. آپوپتوز، تمایز، ضد تکثیری، لوسمی حاد پرومیلوسیتی، مهارکنندهٔ هیستون داستیلاز

Anti-tumor effects of valproic acid and 1,25 dihydroxy vitamin D3 on HL-60 cancer cells

Maryam Rahimi

Received 10.12.2017/ Accepted 31.12.2017/ Published 10.06.2018

Department of Biology, Faculty of Science, Malayer University, Malayer, Iran
E.mail: m.rahimi@malayeru.ac.ir

Abstract. 1,25 dihydroxy VitaminD3, an active metabolite of vitamin D3 has been reported to inhibit the growth of a number of neoplasms such as leukemia and prostate, breast, colorectal and skin cancers. Valproic acid, as a potent histone deacetylase inhibitor, also plays an important role in the inhibition of the proliferation of tumor cells. However, there has been no reports on the cooperation between valproic acid and Vitamin D3 for anti-leukemic effect so far. The goal of the present research was to determine whether low doses of Vitamin D3 potentiate the toxicity of valproic acid and whether this toxic action is mediated via apoptotic mechanisms. In this study, HL-60 cells were treated either with different concentrations of valproic acid and Vitamin D3 alone or in combination with each other for 24 hours. Cell survival was determined by MTT assay and then Hoechst staining was used to determine the type of cell-death. The results indicate that Vitamin D3 potentiates the antitumor effects of valproic acid. Also, the results of cell-staining showed that valproic acid and Vitamin D3 induced apoptosis in HL-60 cells. In sum, the new combination of valproic acid and Vitamin D3 showed synergistic anti-proliferative effect and induced apoptosis in HL-60 cancer cells.

Keywords. acute promyelocytic leukemia, anti-proliferation, apoptosis, differentiation, histone deacetylase inhibitor

مقدمه

یکی از انواع سرطان‌های خون لوسمی حاد پرومیلوسیتی Acute Promyelocytic Leukemia (APL) است. این نوع از لوسمی را اولین‌بار هماتولوژیست‌های فرانسوی در سال ۱۹۴۹، باعنوان لوسمی همراه با خون‌ریزی شدید گزارش کردند. این نوع سرطان با حضور فراوان سلول‌های نابالغ پرومیلوسیتی در مغز استخوان و جریان خون محیطی همراه است (Zhang *et al.*, 2001). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 با نام متداول کلسیتریول، علاوه بر نقش مهم خود در هومئوستازی کلسیم در بدن، تقریباً بر تمام سلول ها تأثیر می‌گذارد و یکی از عوامل مهم طبیعی در مبارزه با سلول‌های سرطانی است. مطالعات تجربی نشان داده است که ۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 توانایی ورود به سلول‌های سرطانی و القای مرگ سلولی در آنها را دارد (Corcoran *et al.*, 2016; Chirumbolo, 2015). علاوه براین ۱،۲۵دی‌هیدروکسی ویتامین D3 توانایی تقویت فعالیت ضدتومور تعدادی از داروهای سیتوتوکسیک در مدل‌های in vivo را نشان داده است. اما ازآن‌جایی که به‌کاربردن غلظت‌های بالای کلسیتریول اثر سمی دارند و همچنین باعث به‌وجودآمدن عوارض جانبی hypercalcemia می‌شود برای مقابله با این محدودیت راه‌کارهای دیگری را ارائه داده‌اند، ازجمله اینکه موادی همراه با غلظت کم کلسیتریول به‌کار برند تا اثر ضدتوموری آن افزایش یابد. مطالعات قبلی نشان داده است برخی مواد که اثر آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدتکثیری دارند، توانایی این را دارند که همراه با غلظت‌های کم کلسیتریول توان ضدتوموری آن را افزایش دهند (Wang *et al.*, 2005; Mohseni-Kouchesfahani *et al.*, 2017). اخیراً دانشمندان نشان دادند که والپروئیک اسید Valproic acid که به‌طور طبیعی در سنبل کوهی *Valeriana officinalis* L. یافت می‌شود و در درمان صرع و انواع خاصی از افسردگی‌ها و پیشگیری از میگرن به‌کار می‌رود، به‌واسطهٔ عملکرد مهارکنندگی هیستون داستیلازها در درمان ایدز و سرطان نیز نقش مؤثری دارد (Hicks *et al.*, 2011; Loscher, 2002; Kostrouchova *et al.*, 2007). این ترکیب به‌سبب اثر مهارکنندهٔ هیستون داستیلاز به‌مثابهٔ عامل ضدسرطان بررسی شده است. محققان نشان داده اند که می‌توان به‌تنهایی یا در ترکیب با شیمی‌درمانی و پرتودرمانی برای القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی از این گیاه استفاده کرد. اثر ضدسرطانی این ترکیب بر سلول‌های سرطانی سینه و کولون و لوسمی میلوبلاستیک و لوسمی حاد پرومیلوسیتیک نیز بررسی شده است (Shi *et al.*, 2016; Debeb *et al.*, 2010; Harikrishnan *et al.*, 2008; Li *et al.,* 2010). ازآنجایی‌که تاکنون هیچ گزارشی دربارهٔ همکاری بین داروی والپروئیک اسید و ۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 برای القای اثر ضدتکثیری بر سلول‌های سرطانی انجام نشده است، مطالعهٔ حاضر برای بررسی ترکیبی اثر هر دو ماده بر سلول‌های سرطانی حاد پرومیلوسیتی صورت گرفته است. در این مطالعه، از این خاصیت والپروئیک اسید برای مهار هیستون داستیلازها به‌تنهایی و در ترکیب با ۱، ۲۵دی هیدروکسی ویتامین D3 در سلول‌های HL-60 استفاده شد و همچنین نوع مرگ القایی توسط این مواد نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و آماده‌سازی غلظت‌های مختلف مواد

در این مطالعهٔ تجربی، ردهٔ سلولی سرطان حاد پرومیلوسیتی HL60 (NCBI Code: C217) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI1640 (SIGMA) در حضور ۱۰ درصد FBS Fetal Bovine Serum (Gibco) و ۱ درصد پنی-سیلین-استرپتومایسین (Gibco) کشت داده شد. مادهٔ ۱،۲۵دی-هیدروکسی ویتامین D3 در اتانول مطلق حل شد و داروی والپروئیک اسید از داروخانه تهیه شد. سپس، قرص‌ها با هاون پودر شدند. با توجه به وزن مولکولی دارو و غلظت‌های مورد نظر آن، مقدار لازم وزن شد و در یک میلی لیتر DMSO حل شد و به این صورت محلول‌های اولیه به‌دست آمد. برای کاستن اثرحلال‌ها بر سلول‌ها جهت رقیق‌کردن محلول اولیه، در مراحل بعدی از محیط کشت خالی استفاده شد. غلظت‌های مورد استفاده از ۱،۲۵-دی هیدروکسی ویتامین D3، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ نانومولار (nM) و والپروئیک‌اسید ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار (mM) بود.

بررسی درصد سلول‌های زنده

برای بررسی درصد سلول‌های زنده از آزمون MTT استفاده شد. به‌طورخلاصه، روش MTT بدین صورت انجام گرفت: ابتدا، تعداد مناسب ۵×۱۰^{۵} سلول در هر میلی‌لیتر و غلظت مواد مورد

نظر در خانه‌های یک پلیت ۲۴ خانه تنظیم شد و برای هر غلظت از مادهٔ مورد نظر سه خانه درنظر گرفته شد. بعد از بازه‌های زمانی معین به هر خانه از پلیت‌های ۲۴ خانه ۲۰۰میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (Sigma) افزوده شد و سپس ۴ ساعت در دمای ۳۷درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این مرحله، پلیت‌ها برای ۵ دقیقه با دور 800 rpm سانتریفوژ شدند. سپس، محیط رویی با احتیاط خارج شد و بعد به هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Merck) اضافه شد پس از گذشت ۳۰ دقیقه، محتوای خانه‌ها چندین‌بار پیپتاژ شد تا رسوب داخل سلول‌ها بیرون بریزد. سرانجام میزان جذب نوری(OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ثبت شد. سپس، درصد سلول‌های زنده در هر چاهک از تقسیم OD آزمون بر OD کنترل ضرب‌در صد به‌دست آمد.

تعیین اثر متقابل والپروئیک اسید و ۲۵،۱ - دی هیدروکسی ویتامین D3 بر سلول‌های HL-60

اثر متقابل والپروئیک اسید و ۲۵،۱-دی هیدروکسی ویتامین D3 با استفاده ازMTT assay ارزیابی شد. شاخص ترکیبی CI توسط نرم‌افزار Calcusin محاسبه شد. CI=1،CI<1 و CI>1 در این نرم‌افزار به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ اثر هم‌افزایی، افزایشی و آنتاگونیستی است (Chou, 2006).

مطالعهٔ ریخت‌شناسی سلول‌های آپوپتوزی با رنگ‌آمیزی Hoechst

به‌منظور بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آنکه مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس است، از میکروسکوپ فلورسنس و رنگ آمیزی Hoechst استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی، سلول-های طبیعی به‌صورت رنگ آبی یک‌نواخت دیده می‌شوند، درصورتی‌که هستهٔ سلول‌های دستخوش آپوپتوزیس به‌واسطهٔ متراکم‌شدن کروماتین و قطعه‌قطعه‌شدن هسته، به‌طور غیرمنظم و به‌صورت نقاط آبی درخشان قابل مشاهده است. برای تهیهٔ این محلول، ۱ میلی‌گرم رنگ Hoechst در ۱ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. بعد از رسوب و شست‌وشوی سلول‌های تیمارشده با غلظت‌های IC50 یعنی با غلظت‌های ۶mM والپروئیک اسید و ۵۰nM ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 به‌تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر با PBS، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱ میکرولیتر از رنگ هوخست مخلوط و ۱۰میکرولیتر از آن روی لام قرار داده شد. سپس، با میکروسکوپ فلوئورسانس(Nikon, Japan) مشاهده شد (Rowinsky, 1997).

تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار INSTAT-3 و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شده و نمودارها ازطریق برنامهٔ EXCEL رسم شدند. $p>۰/۰۵$ معنی‌دار بودن داده‌ها تلقی شد و هر آزمایش دست‌کم سه مرتبه تکرار شد. داده‌ها نشان‌دهندهٔ means ± SD از سه آزمایش جداگانه است.

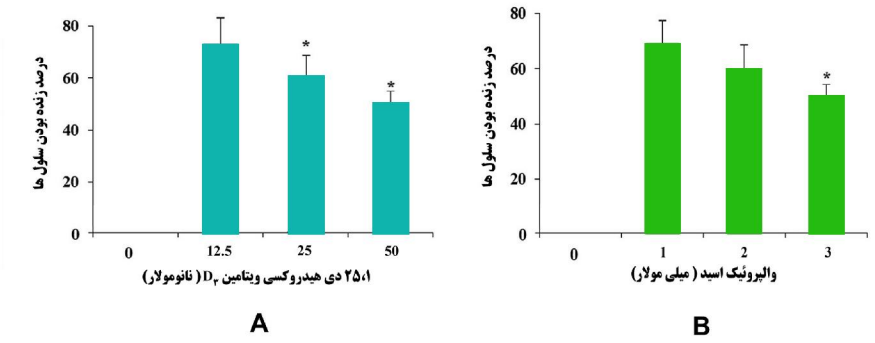
نتایج

اثر ضدتکثیری والپروئیک اسید و۲۵،۱ -دی هیدروکسی ویتامین D3 بر سلول‌های HL-60

اثر والپروئیک‌اسید و ۲۵،۱- دی‌هیدروکسی ویتامین D3 به-تنهایی در دامنه‌ای از غلظت‌ها بر سلول‌های HL-60 بررسی شد. همان‌طور که در شکل A1- نشان داده شده است، ۲۵،۱ - دی هیدروکسی ویتامین D3 در یک رفتار وابسته به‌غلظت با IC_{50} ۵۰ نانومولار در ۲۴ ساعت تکثیر سلول‌های HL-60 را مهار می‌کند. به‌طور مشابهی، همان‌طور که در شکل B1- می‌بینید، والپروئیک-اسید هم وابسته به غلظت با IC_{50} ۳ میلی‌مولار تکثیر سلول-های HL-60 را مهار می‌کند.

هم‌افزایی اثر ضدتکثیری والپروئیک اسید و ۲۵،۱ – دی-هیدروکسی ویتامین D3 بر سلول‌های HL-60

سلول‌های HL-60 به‌مدت ۲۴ ساعت هم‌زمان با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ نانومولار ۲۵،۱-دی‌هیدروکسی ویتامین D3 و ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار والپروئیک‌اسید تیمار شدند. همان‌طور که در شکل A۲ نشان داده شده است مقادیر CI در دامنهٔ ۰/۳۴-۰/۵۶ (CI<1) بود که نشان‌دهندهٔ اثر هم‌افزایی ضد توموری ترکیب والپروئیک اسید و ۲۵،۱-دی‌هیدروکسی ویتامین D3 بر سلول-های HL-60 است. هنگامی که غلظت والپروئیک اسید ۳ میلی مولار و ۲۵،۱-دی‌هیدروکسی ویتامین D3 ۵۰ نانومولار باشد، CI حداقل مقدار است. بنابراین، غلظت‌های مطلوب دو ماده برای اثر هم‌افزایی به‌دست آمد. سپس، سلول‌های HL-60 با سه میلی مولار والپروئیک اسید به‌همراه ۵۰ نانومولار ۲۵،۱-دی‌هیدروکسی ویتامین D3 به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و میزان مهار تکثیر آنها به‌طور درخورتوجهی از ۴۶/۳۴±۴۸ درصد برای ۵۰

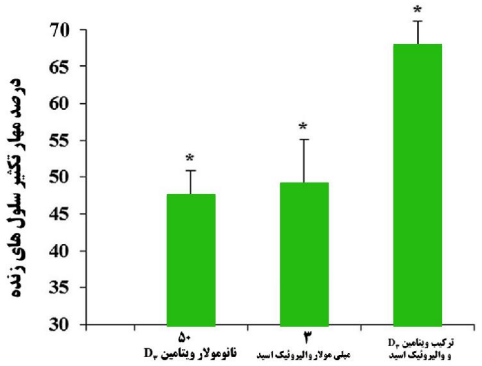


شکل ۱– اثر والپروئیک اسید و ۲۵،۱– دی هیدروکسی ویتامین D3 به‌تنهایی بر تکثیر سلول‌های HL-60. سلول‌های HL-60 با غلظت‌های مختلف **A:** ۲۵،۱–دی هیدروکسی ویتامین D3 و **B:** والپروئیک اسید به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. تکثیر سلولی با روش MTT اندازه‌گیری شد. اعدادنشان‌دهندهٔ means± SD از سه آزمایش جداگانه است.

Fig. 1. The effect of valproic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 alone on the proliferation of HL-60 cells. HL-60 cells were treated with different concentrations of **A:** 1,25-dihydroxyvitamin D3 and **B:** valproic acid for 24 h. Cell proliferation was measured by MTT assay. Values represent the means ± SD in triplicates in three separate experiments.

CDI		۲۵،۱ دی هیدروکسی ویتامین D_3 (نانومولار)		
		۱۲/۵	۲۵	۵۰
والپروئیک اسید (میلی مولار)	۱	۰/۵۵	۰/۴۴	۰/۳۵
	۲	۰/۵۸	۰/۴۶	۰/۳۶
	۳	۰/۵۲	۰/۴۲	۰/۳۲

A



B

شکل ۲– اثر والپروئیک اسید و ۲۵،۱ – دی هیدروکسی ویتامین D3 در ترکیب با یکدیگر بر تکثیر سلول‌های HL-60. **A:** سلول‌های HL-60 به مدت ۲۴ ساعت همزمان با غلظت های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ نانومولار ۱ ،۲۵– دی هیدروکسی ویتامین D3 و ۱، ۲ و ۳ میلی مولار والپروئیک اسید قرار گرفتند و **B:** سلول‌های HL-60 به‌مدت ۲۴ ساعت با ۳ میلی مولار والپروئیک اسید و ۵۰ نانومولار ۲۵،۱– دی هیدروکسی ویتامین D3 در ترکیب با یکدیگر قرار گرفتند و میزان مهار تکثیر سلول‌ها توسط سنجش MTT بررسی شد. اعداد نشان دهندهٔ means ± SD از سه آزمایش جداگانه است.

Fig. 2. The effect of valproic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in combination with each other on the proliferation of HL-60 cells. **A:** HL-60 cells were treated with 1,25-dihydroxyvitamin D3 (12.5, 25 and 50 μM) and valproic acid (1, 2 and 3 mM) concurrently for 24 h. **B:** HL-60 cells were co-exposed to 50 μM 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 3 mM valproic acid for 24 h, then cell viability was measured by MTT assay. Values represent the means ± SD of three separate experiments.

نانومولار ۲۵،۱–دی‌هیدروکسی ویتامین D3 و ۴۰/۲۳ ± ۴۹درصد برای ۳ میلی مولار والپروئیک اسید به ۴۸/۳۵ ±۶۸ درصد در ترکیب با یکدیگر افزایش پیدا کرد که تأییدکنندهٔ اثر هم‌افزایی اثر مهاری والپروئیک اسید و ۲۵،۱– دی‌هیدروکسی ویتامین D3 بر تکثیر سلول‌های HL-60 است (شکل ۲B).

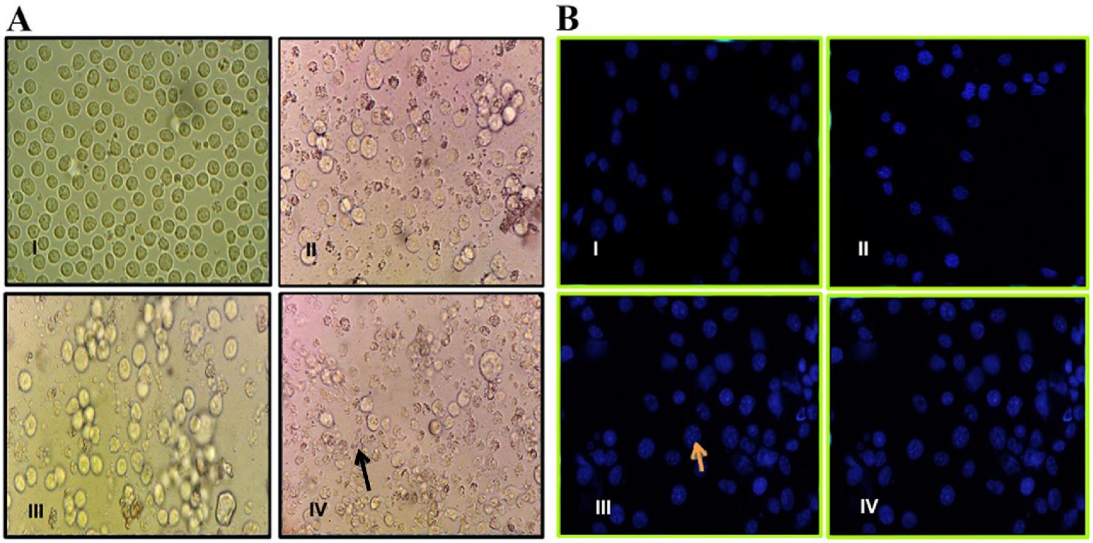
اثر والپروئیک اسید و ۱ ،۲۵–دی‌هیدروکسی ویتامین D3 به‌تنهایی و درترکیب باهم بر نوع مرگ القاشده در سلول‌های HL-60

برای تعیین اثر والپروئیک اسید به‌همراه ۲۵،۱–دی هیدروکسی ویتامین D3 در سلول‌های HL-60، تغییرات مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ نوری معکوس و میکروسکوپ فلورسنت پس از رنگ‌آمیزی Hoechst بررسی شد. بخشی از سلول‌های تیمارشده توسط والپروئیک اسید و ۲۵،۱– دی‌هیدروکسی ویتامین D3 به‌تنهایی با میکروسکوپ نوری معکوس، تراکم سلولی و اجسام آپوپتوتیک را نشان دادند که از ویژگی‌های مورفولوژیکی مرگ

آپوپتوز هست (شکل ۳A). به‌طور مشابه، نتایج رنگ‌آمیزی Hoechst نشان داد که هسته‌های سلول‌های کنترل گرد و رنگ آبی فلورسانس همگنی را نشان می‌دهند. درحالی‌که سلول‌های تیمارشده با والپروئیک اسید و ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 به‌تنهایی برای ۲۴ ساعت هسته‌های متراکم یا تکه‌تکه‌شده، که مشخصه آپوپتوز سلولی است نشان دادند (شکل۳B). علاوه‌براین، آپوپتوز در گروه ترکیبی بیشتر از هر عامل تنها مشاهده شد.

بحث

HL-60 یک ردهٔ سلولی سرطان خون است که از بیماران مبتلا به لوسمی حاد پرومیلوسیتی گرفته شده است. در این لوسمی جابه-جایی کروموزوم t(15:17) صورت می‌گیرد که به الحاق ژن PML (کروموزوم ۱۵) و ژن RAR (کروموزوم ۱۷) و ایجاد ژن الحاقی RAR-PML منجر می‌شود. ژن PML در این سلول‌ها همچون سرکوب‌کنندهٔ تومور عمل می‌کند. PML کارسینوژن-های شیمیایی را مهار می‌کند و همچون یک عامل پیش آپپتوز عمل می‌کند. هنگامی که این جابه‌جایی کروموزومی ایجاد می-شود، دیگر پروتئین PML نمی‌تواند به‌طور طبیعی عمل خود را انجام دهد. پروتئین الحاقی RAR-PML فعالیت مهاری ژن PML را تخریب می‌کند، بنابراین اجازهٔ تکثیر پرومیلوسیت‌های نابالغ را می‌دهد (Wang *et al*., 2005; Hikita *et al*., 2017). در سال‌های اخیر، پروتکل‌های درمانی برای سرطان مطرح‌شده در مراکز تحقیقاتی بررسی و تجزیه و تحلیل شده‌اند. از پروتکل‌های درمانی که تا به امروز برای این سرطان مورد استفاده قرار گرفته است به‌طور معمول شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است. این روش‌ها با نواقصی نیز همراه هستند. علم بیولوژی در روند درمان سرطان بیشتر سعی می‌کند از روش‌هایی استفاده کند که سلول‌های سرطانی به مسیر عادی رشد و نمو و تمایز و درنهایت مرگ برنامه-ریزی‌شدهٔ خود برگردند. براین‌اساس، یک روش نسبتاً جدید در درمان سلول‌های سرطانی استفاده از ترکیباتی است که به‌تنهایی یا به‌صورت ترکیبی رشد سلول‌های سرطانی و مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ آنها را اصلاح می‌کنند (Spira *et al*., 2003; Imran *et al*., 2017; Kamada *et al*., 2017). نتایج پژوهش ما نشان داد که ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 و والپروئیک اسید در رفتار وابسته به غلظت در ۲۴ ساعت تکثیر سلول‌های HL-60 را مهار می‌کنند. مقادیر CI نشان‌دهندهٔ اثر هم‌افزایی ضدتوموری ترکیب والپروئیک اسید و ۲۵،۱-دی هیدروکسی ویتامین D3 بر سلول‌های HL-60 بود. مشاهده شد هنگامی که غلظت والپروئیک اسید ۳ میلی مولار و ۲۵،۱-دی‌هیدروکسی ویتامین D3 ۵۰ نانو مولار باشد، CI حداقل مقدار است و حداکثر هم افزایی را خواهند داشت. به‌طوری‌که میزان مهار تکثیر سلول‌های HL-60 از ۴۸±۴۶/۳۴ درصد برای ۵۰ نانومولار ۲۵،۱-دی هیدروکسی ویتامین D3 و ۴۹±۴۰/۲۳ درصد برای ۳ میلی مولار والپروئیک اسید به ۶۸±۴۸/۳۵ درصد در ترکیب با یکدیگر افزایش پیدا کرد که تأییدکنندهٔ اثر هم‌افزایی مهاری والپروئیک اسید و ۲۵،۱- دی هیدروکسی ویتامین D3 بر تکثیر سلول‌های HL-60 است. علاوه-براین، نوع مرگ سلول در سلول‌های تیمارشده با سه میلی مولار والپروئیک اسید و ۵۰ نانومولار ۲۵،۱-دی هیدروکسی ویتامین D3 به‌تنهایی از نوع آپوپتوز تشخیص داده شد که آپوپتوز در گروه ترکیبی بیشتر از هر عامل تنها مشاهده شد. اخیراً مشاهده شده که هیستون داستیلازها در سلول‌های سرطانی بیان بالایی دارند که باعث سرکوب نسخه‌برداری ژن‌های سرکوب‌کنندهٔ تومور می‌شود و درنهایت تمایز و آپوپتوز را در این سلول‌ها مختل می‌کنند. والپروئیک اسید یک مهارکنندهٔ مؤثرهیستون داستیلاز است. اثر ضد سرطانی این ترکیب بر روی سلول‌های نوروبلاستوما، سرطان پستان، گلیوما، سرطان روده بزرگ، هپاتوکارسینوما، سرطان دهانهٔ رحم، اندومتریال، ملانوما، تخمدان، نورواکتودرمال، تراتوکار-سینوما، مدولابلاستوما و فیبروسار-کوما بررسی شده است. نتایج این تحقیقات نشان داده‌اند که والپروئیک‌اسید در غلظت‌های ۲ تا ۳ میلی مولار القاکنندهٔ شدید مهار رشد، توقف چرخهٔ سلولی، و آپوپتوز است و فعالیت تشکیل کلونی و تومورزایی را به‌صورت وابسته به مقدار و زمان سرکوب می‌کنند که نتایج مطالعهٔ حاضر هم‌راستا با مطالعات مذکور هم‌سو است و آنها را تأیید می‌کند (Duenas *et al*., 2008; Karagiannis *et al*., 2006). مطالعات قبلی نشان داده است که فعالیت ضدتوموری والپروئیک اسید وابسته به القای هایپراستیلاسیون هیستون‌های H3 و H4 و توقف بیان CDK4،TP53 و CMYC و افزایش فعالیت P21 است (Li *et al*., 2005; Chen *et al*., 2007; She *et al*., 2016). همچنین مطالعات قبلی نشان داده که ویتامین D3 با نام متداول کلسیتریول دارای توانایی القای تمایز و آپوپتوز در سلول-



شکل ۳ – اثر ۳ میلی‌مولار والپروئیک اسید و ۵۰ نانومولار ۲۵،۱ –دی هیدروکسی ویتامین D3 به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر نوع مرگ القا شده در سلول‌های HL-60 **A:** تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های HL-60 با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (برگنمایی ۴۰۰) **B:** تغییرات مورفولوژیکی هسته سلول‌ها بعد از رنگ‌آمیزی با Hockest با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (بزرگنمایی ۴۰۰). فلش‌ها نشان دهندهٔ سلولهای آپوپتوزیک هستند.I: کنترل، II: 3 میلی‌مولار والپروئیک اسید، III: 50 نانومولار ۱،۲۵– دی هیدروکسی ویتامین D3، IV: 3 میلی مولار والپروئیک‌اسید به علاوه ۵۰ نانومولار ۱، ۲۵– دی‌هیدروکسی ویتامین D3.

Fig. 3. The effect of 3 mM valproic acid and 50 nM 1, 25-dihydroxyvitamin D3 alone and in combination with each other on the type of death induced in HL-60 cells. **A:** The morphological changes of HL-60 cells were examined by reverse optical microscope (400 x). **B:** Nucleolus cells morphological changes were investigated under fluorescence microscope after Hoechst-33342 staining (400 x). Arrows indicate apoptotic cells. I: control, II: 3 mM valproic acid, III: 50 nM 1, 1, 25-dihydroxyvitamin D3, IV: 50 nM 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and 3 mM valproic acid.

های سرطانی است و می‌تواند به‌طور مستقیم با مهار (CDK1) Cyclin-dependent kinase و سنتز cyclinها و غیرمستقیم با افزایش رونویسی ژن‌های مها کنندهٔ CDK1 مثل P21 و P27 در القای تمایز و آپوپتوز در سلول‌های سرطانی عمل نماید. اما ازآنجایی‌که غلظت‌های بالای ۲۵،۱– دی هیدروکسی ویتامین D3 سمی هستند و اثر جانبی دارند، راهکار استفاده از ۲۵،۱– دی هیدروکسی ویتامین D3 به‌کاربردن موادی همراه آن است که اثر ضدتکثیری ۲۵،۱– دی‌هیدروکسی ویتامین D3 را تقویت کند. در مطالعات گذشته نشان داده شد که برخی از مواد که خاصیت ضدتکثیری و التهابی دارند می‌توانند همراه ۲۵،۱– دی هیدروکسی ویتامین D3 توان تمایزی و آپوپتوزی آن را افزایش دهند (Luong & Koeffler, 2005; Christian *et al*., 2014; Datta-Mitra *et al*., 2013). مرور منابع علمی نشان داد که اثر والپروئیک اسید به‌همراه ویتامینِ D3 بر سلول‌های HL-60 بررسی نشده است، درحالی‌که اثر مهاری والپروئیک اسید و ویتامین D3 جداگانه روی تکثیر سلول‌های HL-60 گزارش شده است که نتایج مطالعهٔ حاضر با مطالعات مذکور هم‌سو است و آنها را تأیید می‌کند. براساس بررسی‌ها و مطالعات انجام‌شده، والپروئیک اسید توان ضدتکثیری ۲۵،۱– دی هیدروکسی ویتامین D3 را افزایش می‌دهد و در پیش‌گیری و کاهش سرطان مؤثر واقع می‌شود. در این تحقیق، نتایج نشان داد که والپروئیک اسید و ۲۵،۱– دی هیدروکسی ویتامین D3 موجب آپوپتوز در سلول‌های HL-60 می‌شوند، ولی برای بررسی‌های بیشتر و پی‌بردن به سازوکار دقیق، تحقیقات بیشتر و دقیق‌تری لازم است.

سپاسگزاری

نویسندهٔ مقاله از کارشناسان آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشگاه ملایر به سبب راهنمایی و مساعدت در انجام این تحقیق قدردانی می نماید.

REFERENCES

Chen, B.A., Zhao, H.H., Gao, C., Shao, Z.Y., Xia, G.H. and Dohner, K. 2007. Effects of sodium valproate on proliferation and apoptosis of human myelodysplastic syndromes cell line MUTZ-1. – Ai Zheng. 26: 1323-

1329.

Chirumbolo, S. 2015.Vitamin D3 in cancer prevention and therapy: the nutritional issue. – Horm. Mol. Biol. Clin. Investig. 23: 71-8.

Chou, T.C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. – Pharmacol. Rev. 58: 621-681.

Rogers, C.S., Yedjou, C.G., Sutton, D.J. and Paul, B.T. 2014. Vitamin D3 potentiates the antitumorigenic effects of arsenic trioxide in human leukemia (HL-60) cells. – Exp. Hematol. Oncol. 3: 9-17.

Corcoran, A., Nadkarni, S., Yasuda, K., Sakaki, T., Brown, G., Kutner, A. and Marcinkowska, E. 2016. Biological evaluation of double point modified analogues of 1, 25-Dihydroxyvitamin D_2 as potential anti-leukemic agents. – Int. J. Mol. Sci. 17: 91-101.

Datta-Mitra, A., Mitra, A., Ray, R., Raychaudhuri, S.P. and Kundu-Raychaudhuri, S. 2013. 1, 25-Dihydroxyvi-tamin D3-3-bromoacetate, a novel vitamin D analog induces immunosuppression through PI-3K/Akt/mTOR signaling cascade. – Int. Immuno-pharmacol. 17: 744-51.

Debeb, B.G., Xu, W., Mok, H., Li, L., Robertson, F. and Ueno, N.T. 2010. Differential radiose-nsitizing effect of valproic acid in differentiation versus self-renewal promoting culture cond-itions. – Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 76: 889-95.

Duenas, G.A., Candelaria, M., Perez, P.C., Peza, C.E, Cruz, H.E. and Herrera, L. 2008. Valproic acid as epigenetic cancer drug: percl-inical, clinical and transcriptional effect on solid tumors. – Cancer Treat. Rev. 34: 206-222.

Harikrishnan, K.N., Karagiannis, T.C., Chow, M.Z. and El-Osta, A. 2008. Effect of valproic acid on radiation-induced DNA damage in euch-romatic and heterochromatic compartments. – Cell Cycle 7: 468-76.

Hicks, C.W., Pandya, M.M. and Fernande, Z. 2011. Valproate for the treatment of medication-induced impulse-control disorder in three patients with parkinsons disease. – Parkinsonism Relat. Disord. 17: 379-381.

Hikita, K., Hattori, N., Takeda, A., Yamakage, Y., Shibata, R., Yamada, S., Kato, K., Murata, T., Tanaka, H. and Kaneda, N. 2017. Potent apoptosis-inducing activity of erypoegin K, an isoflavone isolated from *Erythrina poeppigiana*, against human leukemia HL-60 cells. – J. Nat. Med. 18: 1147-9.

Imran, A., Qamar, H.Y., Ali, Q., Naeem, H., Riaz, M., Amin, S., Kanwal ,N., Ali, F., Sabar, M.F. and Nasir, I.A. 2017. Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. – Iran J. Public Health. 46: 1475-1485.

Kamada, R., Kudoh, F., Yoshimura, F., Tanino, K. and Sakaguchi, K. 2017. Inhibition of Ser/Thr phosphatase PPM1D induces neutrophil differentiation in HL-60 cells. – J. Biochem. 162: 303-308.

Karagiannis, T.C., Kn, H. and El-Osta, A. 2006. The epigenetic modifier, valproic acid, enhances radiation sensitivity. – Epigenetics 1: 131-7.

Kostrouchova, M., Kostrouch, Z. and Kostrouchova, M. 2007. Valproic acid molecular lead to multiple regul-atory pathways. – Folia Biological. 53: 37-49.

Li, Y.Q., Yin, S.M., Feng, S.Q., Nie, D.N., Xie, S.F., Ma, L.P., Wang, X.J. and Wu, Y.D. 2010. Effect of valproic acid on apoptosis of leukemia HL-60 cells and expression of h-tert gene. – Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 18:1445-50.

Li, X.N., Shu, Q., Su, J.M.F., Perlaky, L., Blaney, S.M. and Lau, C.C. 2005.Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histonhyperacetylation and regulation expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. – Mol. Cancer Ther. 4: 1912-1922.

Loscher, W. 2002. Basic pharmacology of valpr-oate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. – CNS Drugs. 16: 669-694.

Luong, Q.T. and Koeffler, P.H. 2005. Vitamin D compounds in leukemia. – Hematol. Oncol. 97: 195-202.

Mohseni-Kouchesfahani, H., Nabioni, M., Khosravi, Z. and Rahimi, M. 2017. Honey bee venom combined with 1, 25-dihydroxyvitamin D3as a highly efficient inducer of differentiation in human acute myeloid leukemia cells. – J. Cancer Res. Ther. 13: 544-549.

Rowinsky, E.K. 1997. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. – Annu. Rev. Med. 48: 353 –74.

Shi, M., Ren, X., Wang, X., Wang, H., Liu, G., Yuan, X., Zheng, S., Yu L., Pan, S., Song, G., Guo, Q., Li, L., Zhang, X., Zhang, Z., Ding, H. and Jiang, G. 2016. A novel combination of oridonin and valproic acid in enhancement of apoptosis induction of HL-60 leukemia cells. – Int. J. Oncol. 48: 734-746.

Spira, A.I. and Carducci, M.A. 2003. Differentiation therapy. – Curr. Opin. Pharmacol. 3: 338-343.

Wang, Q., Harrison, J.S., Uskokovic, M., Kutner, A. and Studzinski, G.P. 2005. Translational study of Vitamin D differentiation therapy of myeloid leukemia: Effects of the combination with a p38 MAPK inhibitor and an antioxidant. Leukemia. 19: 1812-7.

Wang, Q., Salman, H., Danilenko, M. and Studzinski, G.P. 2005. Cooperation between antioxidants and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in induction of leukemia HL60 cell differentiation through the JNK/AP-1/Egr-1 pathway. – J. Cell Physiol. 204: 964-74.

Zhang, T.D., Chen, G.Q., Wang, Z.G., Wang, Z.Y., Chen, S.J. and Chen, Z. 2001. Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. – Oncogene 20: 7146-7153.

*****

How to cite this article:

Rahimi, M. 2018. Anti-tumor effects of valproic acid and 1,25 dihydroxy vitamin D3 on HL-60 cancer cells. – Nova Biologica Rep. 5: 38-44.

رحیمی، م. ۱۳۹۷. اثر ضدتوموری والپروئیک اسید و ۱،۲۵ دی‌هیدروکسی ویتامین D3 بر سلول‌های سرطانی HL-60. – یافته‌های نوین در علوم زیستی. ۵: ۴۴-۳۸.